مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۲، شماره ۱، سال ۱۳۹۵

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و تجزیه ارتباط صفات وابسته به سازگاری به خشکی

Genetic Diversity of Barley (*Hordeum vulgare*) Genotypes Using Microsatellite Markers and Association Analysis of Traits Related to Drought Compatibility

سارا دژستان[۱]، مهدی ایزدی دوگونچی[۲]، علی اصغری[۳] و بهزاد صادق‌زاده[۴]

۱، ۲، ۳ - به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۴- استادیار موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۵

چکیده

دژستان، س.، ایزدی دوگونچی، م.، اصغری، ع. و صادق‌زاده، ب. ۱۳۹۵. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و تجزیه ارتباط صفات وابسته به سازگاری به خشکی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۲: ۸۲-۶۷.**

این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و گروه بندی ۵۲ ژنوتیپ جو زراعت دیم متعلق به کشورهای مصر، ایران و چین (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، مراغه) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام شد. پس از استخراج DNA از برگ‌های جوان، محصولات تکثیری با استفاده از ۵۹ جفت آغازگر ریزماهواره روی ژل الکتروفورز واسرشته‌ساز پلی‌آکریلامید ۴/۵٪ تفکیک شدند. در کل از ۴۰ جفت آغازگر ریزماهواره دارای تکثیر مناسب ۱۳۴ الل چندشکل، با میانگین ۳/۴ الل به ازای هر نشانگر شناسایی شد و متوسط PIC برای کلیه نشانگرها ۰/۴۷ محاسبه شد. براساس نتایج، نشانگرهای ریزماهواره چندشکلی بالایی در ژنوتیپ های جو نشان دادند. در تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ژنوتیپ‌ها به دو گروه اصلی طبقه‌بندی و ژنوتیپ‌های دو ردیفه و شش ردیفه تا حد زیادی از هم تفکیک شدند. تنوع ژنتیکی مطلوبی در درون و بین گروه‌ها وجود داشت. براساس تجزیه ارتباط، ۱۸ نشانگر مثبت سازگاری به خشکی شناسایی شد که در صورت تایید در سایر آزمایش‌ها قابل استفاده در برنامه‌های به‌نژادی هستند. این نشانگرها می‌توانند به‌طور موثر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی ژرم‌پلاسم جو مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: جو، تنوع ژنتیکی،تجزیه ارتباط، نشانگرهای ریز ماهواره.

نویسنده مسئول: sdezhsetan@gmail.com تلفن: ۰۹۱۴۳۰۶۴۲۷۷

مقدمه

از نظر تولید جهانی جو (*Hordeum vulgare* L.) چهارمین غله پس از گندم، برنج و ذرت محسوب می‌شود و در ایران، دومین محصول استراتژیک بعد از گندم است (Anonymous, 2010). بخش عمده دانه جو در تغذیه دام، صنایع مالت و آبجوسازی استفاده می‌شود و در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از جو در تغذیه انسان (به‌دلیل مقدار فیبر قابل‌حل بتاگلوکان که منجر به کاهش کلسترول خون می‌شود) افزایش قابل‌ملاحظه‌ای یافته است (Baik and Ullrich, 2008).

کشاورزی و تولید غذا بستگی به استفاده از ارقام پرمحصول گیاهی دارد. روش‌های کلاسیک اصلاح گیاهان زراعی براساس گزینش ژنوتیپ‌های مناسب از بین ژنوتیپ‌های متنوع موجود در یک مجموعه و دست‌ورزی همه یا تعدادی از صفات ممکن در ژنوتیپ‌های انتخاب شده به‌منظور تولید یک رقم تجاری استوار است (Tanksley and McCouch, 1997). انتخاب بر اساس ژنوتیپ نیازمند وجود تنوع ژنتیکی است. وجود تنوع ژنتیکی کافی در گیاهان امکان تولید ارقام برتر جدید در برنامه‌های اصلاح نباتات، انتخاب نژادهای والدین، پیش‌بینی عملکرد هیبریدها و کاهش آسیب‌پذیری نسبت به عوامل زنده و غیرزنده را باعث می‌شود (Farshadfar, 1997). همچنین، از کاربردهای تنوع ژنتیکی در گیاهان می‌توان به تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، مطالعه ژنتیک جمعیت و مطالعه و حفاظت ذخایر ژرم‌پلاسمی اشاره کرد (Kölliker *et al*., 2001). بررسی تنوع ژنتیکی می‌تواند براساس نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، کروموزومی و DNA انجام شود. نشانگرهای مورفولوژیکی دارای محدودیت‌هایی مانند فقر اطلاعات ژنتیکی و تاثیرپذیری از عوامل محیطی هستند. نشانگرهای بیوشیمیایی و کروموزومی نیز مشکل تعداد کم و چندشکلی پایین را دارند (Rao, 2004).

در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده برای مطالعه تنوع ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی و غیره استفاده شده است (Luan *et al*., 2006). در این میان، نشانگرهای ریزماهواره (Simple Sequence Repeats: SSR) به دلیل ماهیت همبارز، چندشکلی و فراوانی اللی بالا، توزیع نسبتاً تصادفی در ژنوم، تکرارپذیری بالا، ابزاری مناسب و کارا برای مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه پیوستگی و نیز مکان‌یابی ژن‌ها هستند (Meszaros *et al*., 2007). نشانگرهای ریزماهواره با توجه به فراوانی تعداد الل در هر جایگاه حتی قادر به تمایز بین رگه‌های بسیار مشابه نیز هستند (Nachit *et al*., 2001؛ Mohan *et al*., 1997). نقشه‌های پیوستگی مولکولی در بسیاری از گیاهان مدل و گیاهان زراعی مانند آرابیدوپسیس (Cosson *et al*., 2014)،

برنج (McCouch *et al*., 1997)، گندم (Song *et al*., 2005) و کلزا (Xu *et al*., 2010) با افزودن نشانگرهای SSR به سرعت اشباع شدند. ارزش اطلاعاتی نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعات ژنتیکی به عنوان ابزاری قدرتمند برای اصلاح جو در چندین مطالعه تایید شده است (Struss and Plieske, 1998؛ Khodayari *et al*., 2014؛ Castillo *et al*., 2010؛ Pasam *et al*., 2014).

بلوری مقدم و همکاران (Bolouri-Moghaddam *et al*., 2011) برای بررسی تنوع ژنتیکی در هفت رقم جو زراعی از ده نشانگر SSR استفاده کردند و در مجموع ۶۵ الل با میانگین ۹/۲ الل به ازای هر جایگاه ژنی به دست آوردند و اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content: PIC) دارای میانگین ۰/۸۴ بود. مالیشیوا-اتو و همکاران (Malysheva-Otto *et al*., 2006) تعداد ۹۵۳ رقم جو جمع‌آوری شده از کلیه کشورهای جهان را به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۴۸ نشانگر ریزماهواره مورد مطالعه قرار دادند که در این تحقیق ارقام اروپایی کاملاً از بقیه ارقام مجزا شدند. حاج منصور و همکاران (Haj Mansour *et al*., 2010) تنوع ژنتیکی ۶۴ ژنوتیپ جو را با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر ریزماهواره مطالعه کردند و ۱۲۸ الل مشاهده شد که محتوای اطلاعات چندشکلی بین ۰/۴۹ تا ۰/۸۹ (با میانگین ۰/۶۹) متغیر بود. عبدالهی سیسی و همکاران (Abdollahi Sisi *et al*., 2014) تنوع آللی نشانگرهای SSR در توده‌های بومی لاین‌های اصلاحی جو را با ۳۲ جفت آغازگر ریزماهواره مطالعه کردند. گنج‌خانلو و همکاران (Ganjkhanloo *et al*., 2012) نیز تنوع ژنتیکی جو ۳۵ ژنوتیپ جو را با استفاده از ۴۴ جفت آغازگر SSR بررسی کردند.

در این تحقیق هدف بررسی سطح تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ۵۲ ژنوتیپ جو زراعت دیم (متعلق به سه کشور مصر، ایران و چین) مورد استفاده در برنامه به‌نژادی سازگاری به خشکی و تعیین روابط ژنتیکی آن‌ها برای شناسایی والدین مناسب جهت برنامه‌های به‌نژادی و مطالعات ژنتیکی بود. همچنین، تجزیه ارتباط نشانگرهای مولکولی با ارزش‌های فنوتیپی مربوط به صفات سازگاری به خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مولکولی

تعداد ۵۲ ژنوتیپ جو زراعت دیم از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شد. این ژنوتیپ‌ها متعلق به سه کشور مصر، ایران و چین بودند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی گیاهان کشت شده در گلخانه، در مرحله ۴-۶ برگی با استفاده از روش تغییریافته CTAB (Saghai-Maroof *et al*., 1984) انجام شد.

کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. نمونه‌های DNAهای استخراج شده بعد از رقیق کردن به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای بررسی مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره در این آزمایش از ۵۹ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. آغازگرهای ریزماهواره از سایت (http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Barley) انتخاب شدند. مبنای انتخاب آغازگرها پوشش هفت کروموزوم جو بود. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر مخلوط اصلی (Master mix)، ۳ میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و معکوس و ۱ میکرولیتر DNA ژنومی انجام شد. به منظور تکثیر قطعات DNA، چرخه‌های PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ ºC به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها (بسته به آغازگر) در دمای بین ۶۲-۵۳ ºC به مدت ۵۵ ثانیه و مرحله بسط به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ ºC و چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ ºC بودند. برای تفکیک و آشکارسازی فرآورده‌های PCR، از الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید ۴/۵ درصد واسرشته‌ساز و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد. الگوی نواری نشانگرهای چندشکل به صورت همبارز امتیازدهی شدند و در تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ارتباط از امتیازدهی صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) استفاده شد. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضرایب فاصله Maximum composite likelihood (Tamura *et al.*, 2011) و تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA با استفاده از نرم‌افزار (MEGA 5) انجام شد (Tamura *et al.*, 2007). تجزیه واریانس ملکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.2 انجام شد (Peakall and Smouse, 2008). برای هر نشانگر تعداد الل، فراوانی الل شایع، تنوع ژنی و میزان اطلاعات چندشکلی محاسبه شد. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از فرمول زیر:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} pi^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2\, pi^2 pj^2$$

محاسبه شد، به طوری که، p_i و p_j به ترتیب فراوانی الل iام و jام در جایگاه ریزماهواره است (Wei *et al.*, 2005). این پارامترها بر مبنای ۱۰۰۰ نمونه bootstrap با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker V3.25 محاسبه شد (Liu, 2004).

ارزیابی فنوتیپی

به منظور ارزیابی صفات مرتبط با سازگاری به خشکی در این ژنوتیپ‌ها، آزمایش مزرعه‌ای در مراغه و در قالب طرح لاتیس مستطیل در دو تکرار انجام شد و صفات روز تا ظهور سنبله،

روز تا پر شدن دانه، روز تا رسیدگی فیزیولوژیک، وزن هزار دانه و عملکرد (کیلوگرم در کرت) اندازه‌گیری شد. اندازه کرت ۰/۷۵ متر مربع بود. تاریخ کشت نمونه‌های جو، دی ماه و مبنای شمارش تعداد روز، روییدن ۵۰ درصد گیاهچه‌ها از سطح خاک تا ۵۰ درصد سنبله‌دهی، ۵۰ درصد پر شدن دانه و ۵۰ درصد رسیدگی فیزیولوژیک بود. عملکرد به‌صورت کیلوگرم در کرت بعد از برداشت کل محصول کرت محاسبه شد.

با توجه به اطلاعات هواشناسی ایستگاه تحقیقاتی دیم مراغه، در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ میزان بارندگی در ایستگاه مراغه ۳۵۱ میلی‌متر بوده که برابر میانگین بلندمدت بود ولی نسبت به سال زراعی قبل ۲۹ درصد کاهش نشان داد. پراکنش بارندگی در پاییز ۱۷، در زمستان ۱۴۲ و در بهار ۱۹۳ میلی‌متر بود. به‌عبارت دیگر، ۵ درصد بارش‌ها در پاییز، ۴۰ درصد در زمستان و ۵۵ درصد در بهار به‌وقوع پیوست. به‌دلیل نبود بارندگی در خرداد و تیر ماه و افزایش دما، گیاهان با تنش خشکی در مرحله پرشدن دانه مواجه شدند. در یک جمع‌بندی از وضعیت آب و هوایی حاکم بر سال زراعی می‌توان اظهار کرد که براساس میزان کل و پراکنش بارندگی شرایط دیم در منطقه حاکم بود و مواد گیاهی تحت بررسی در این سال با گرما و خشکی آخر فصل زراعی مواجه شدند.

تجزیه ارتباط

به‌منظور شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل پنج صفت مرتبط با سازگاری به خشکی، تجزیه ارتباط براساس نشانگرهای ریزماهواره و ارزش‌های فنوتیپی اندازه‌گیری شده انجام شد. برای هر صفت، نشانگرهایی در تجزیه رگرسیون چندگانه گام به گام وارد شدند که ضریب همبستگی پیرسون آن‌ها با صفت مورد نظر در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار شده بود. این الل‌ها به عنوان متغیر مستقل و صفات مورد ارزیابی به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند. برای کاهش خطای نوع اول در تجزیه رگرسیون، سطح احتمال معنی‌داری برای ورود متغیرها به مدل ۰/۰۱ و برای خروج متغیرها از مدل سطح احتمال ۰/۰۵ منظور شد.

نتایج و بحث

شماره قابل دسترسی در بانک ژن و منشاء ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

از ۵۹ جفت آغازگر ریزماهواره به کاررفته ۴۰ جفت دارای تکثیر مطلوب بودند و در ۵۲ ژنوتیپ جو چندشکلی مناسب ایجاد کردند. در کل ۱۳۴ الل، با میانگین ۳/۴ الل به ازای هر نشانگر شناسایی شد. در مجموع تعداد الل نشانگرها از ۲ تا ۶ الل متغیر بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که نشانگرهای SSR دارای چند شکلی بالایی در ژنوتیپ‌های جو بودند و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در این ژنوتیپ‌ها وجود

جدول ۱- شماره و منشاء ژنوتیپ‌های جو استفاده شده در این تحقیق

Table 1. The Accession number and origin of used barley genotypes in this research

No.	Accession number	Origin	No.	Accession number	Origin	No.	Accession number	Origin
1	71557	Egypt	19	72322	China	37	72480	Iran
2	71576	Egypt	20	72322	China	38	72480	Iran
3	71576	Egypt	21	72368	China	39	72488	Iran
4	71576	Egypt	22	72368	China	40	72494	Iran
5	71591	Egypt	23	72368	China	41	72498	Iran
6	71591	Egypt	24	72368	China	42	72498	Iran
7	71608	Egypt	25	72372	China	43	72500	Iran
8	71614	Egypt	26	72372	China	44	72520	Iran
9	71614	Egypt	27	72397	China	45	72522	Iran
10	71630	Egypt	28	72397	China	46	72524	Iran
11	71630	Egypt	29	72406	China	47	72524	Iran
12	71657	Egypt	30	72406	China	48	72524	Iran
13	72113	China	31	72439	China	49	72545	Iran
14	72295	China	32	72439	China	50	72546	Iran
15	72295	China	33	72439	China	51	72559	Iran
16	72295	China	34	71441	Iran	52	72562	Iran
17	72322	China	35	72466	Iran			
18	72322	China	36	72472	Iran			

داشت.

نشانگر scssr05939 و Bmag0613 دارای بیشترین PIC (۰/۷۷) و نشانگر HVM30b دارای کمترین PIC (۰/۰۷) بود. در کل متوسط PIC برای کلیه نشانگرها ۰/۴۷ محاسبه شد (جدول ۲) که نشان می‌دهد، نشانگرهای ریزماهواره حاوی اطلاعات چندشکلی بالایی هستند. حمزا و همکاران (Hamza *et al*., 2004) از ۱۷ جفت آغازگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم جو تانزانیایی استفاده کردند و مقدار PIC را ۰/۴۵ گزارش کردند. مقدار PIC گزارش شده توسط پیلن و همکاران (Pillen *et al*., 2000) برای ۲۲ جفت آغازگر ریزماهواره در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم زراعی جو آلمانی و دو گونه وحشی جو ۰/۳۸ بود. در حقیقت، ژنوتیپ‌هایی با منشاء یکسان تنوع ژنتیکی محدودی دارند. زیرا، محتمل است این ژنوتیپ‌ها از طریق تلاقی مواد ژنتیکی خود را معاوضه کرده باشند. باوجود این، میزان اطلاعات چندشکلی یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها است که در حقیقت

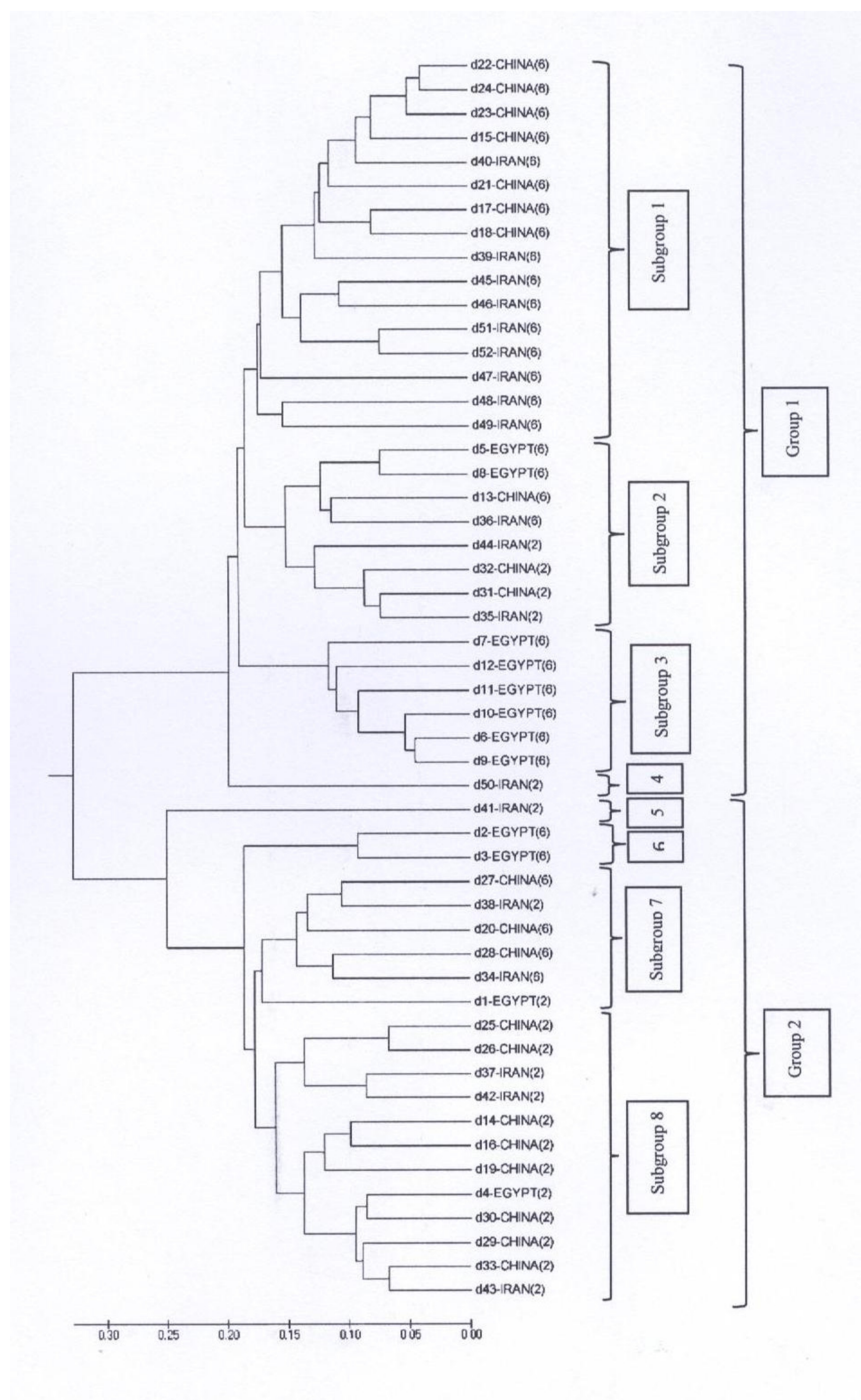
جدول ۲- تعداد الل، فراوانی الل شایع، تنوع ژنی، میزان هتروزیگوتی، میزان اطلاعات چند شکلی و مکان کروموزومی آغازگرهای ریزماهواره (http:// wheat.pw.usda.gov/GG2/Barley) در ژنوتیپ‌های جو

Table 2. Allele number [a], Major allele frequency [b], gene diversity [c], polymorphic information content [d] and chromosomal location [e] for SSR primers (http:// wheat.pw.usda.gov/GG2/Barley) in barley genotypes

آغازگر	تعداد الل	فراوانی الل شایع	تنوع ژنی	PIC	مکان کروموزومی	آغازگر	تعداد الل	فراوانی الل شایع	تنوع ژنی	PIC	مکان کروموزومی
Primer	a	b	c	d	e	Primer	a	b	c	d	e
scssr04163	5	0.55	0.62	0.57	1	Bmac0144	4	0.32	0.74	0.69	5
GBM1412	4	0.86	0.26	0.25	1	Bmag0323	5	0.46	0.69	0.65	5
GBM1334	2	0.96	0.08	0.08	1	GBM1426	3	0.57	0.58	0.51	5
GBM1092	2	0.50	0.50	0.38	1	scssr16991	5	0.42	0.65	0.58	5
GBM1278	2	0.88	0.21	0.19	1	scssr05939	6	0.29	0.80	0.77	5
Bmag0113h	2	0.50	0.50	0.38	1	GBM1231	3	0.50	0.58	0.50	5
GBM1446	3	0.47	0.63	0.55	2	GBM1295	4	0.29	0.74	0.69	5
HvXan	2	0.51	0.50	0.37	2	GBM5008	4	0.50	0.65	0.59	5
GBM1459	4	0.38	0.69	0.63	2	GBM1490	3	0.62	0.53	0.47	5
GBM1232	3	0.69	0.47	0.41	2	GBM1355	4	0.68	0.47	0.40	6
GBM1149	4	0.36	0.73	0.69	2	GBM1212	2	0.80	0.32	0.27	6
GBM1300	2	0.50	0.50	0.38	3	GBM1423	2	0.59	0.48	0.37	6
Bmac0067	3	0.69	0.45	0.38	3	Bmag0613	6	0.22	0.80	0.77	6
GBM1495	5	0.31	0.78	0.75	3	GBM1140	3	0.82	0.31	0.27	6
GBM1118	2	0.69	0.43	0.34	3	GBM1274	3	0.54	0.53	0.43	6
HVM77	2	0.50	0.50	0.38	4	GBM1404	2	0.73	0.39	0.32	6
HVKNOX3	2	0.54	0.50	0.37	4	HvWaxy4	4	0.47	0.66	0.60	7
Bmag0138	4	0.40	0.70	0.65	4	HVM30b	2	0.96	0.07	0.07	7
GBM1176	4	0.29	0.74	0.69	5	Bmac0047	4	0.64	0.50	0.42	7
scssr07106	4	0.29	0.74	0.70	5	BMAG0746	4	0.48	0.55	0.45	7

بیانگر قدرت تفکیک یک نشانگر براساس تعداد الل‌ها و فراوانی نسبی این الل‌ها در جمعیت نیز هست (Senior *et al*., 1998). همچنین، سطح بالای PIC، ممکن است به علت سطح چند شکلی نشانگرهای ریزماهواره نیز باشد. در نتیجه، انتخاب نشانگرهای شدیداً چندشکل به افزایش ارزش PIC کمک می‌کند (Struss and Plieske, 1998).

به منظور بررسی و درک بیشتر روابط ژنوتیپ‌ها، فاصله ژنتیکی بین آن‌ها محاسبه شد و نمودار درختی حاصل رسم گردید (شکل ۱). برش نمودار درختی، ژنوتیپ‌ها را به دو گروه



شکل۱- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای UPGMA با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره چندشکل. (۲): جو دو ردیفه و (۶): جو شش ردیفه

Fig. 1. Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis using polymorphic microsatellite markers. (2): two-rowed barley and (6): six-rowed barley

اصلی تفکیک کرد. گروه ۱ شامل زیرگروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و گروه ۲ شامل زیرگروه‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ بود (برخی از زیرگروه‌ها فقط شامل یک یا دو ژنوتیپ بودند). در نمودار درختی ژنوتیپ‌ها براساس دو ردیفه و شش ردیفه بودن تا حدود زیادی از هم تفکیک شدند. در نمودار درختی در بیشتر موارد جوهای شش ردیفه و دو ردیفه ایرانی، چینی و مصری با هم گروه‌بندی شده‌اند که احتمالاً نشان‌دهنده منشاء مشترک ژنوتیپ‌های دو ردیفه و ژنوتیپ‌های شش ردیفه است.

تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA: Analysis of Molecular Variance) براساس ماتریس فاصله هاف و همکاران (Huff *et al.*, 1993) بین دو گروه اصلی نمودار درختی انجام شد (جدول ۳). واریانس درون گروه‌ها بیشترین مقدار واریانس کل را به خود اختصاص داد. بنابراین، از تنوع درون و بین گروه‌ها می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی و گزینشی بهره جست.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی بین دو گروه اصلی حاصل از تجزیه خوشه‌ای

Table 3. Analysis of molecular variance among two major groups obtained from cluster analysis

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	مجموع مربعات Sum of square	میانگین مربعات Mean of square	واریانس تخمینی Est. Var.	سطح احتمال P≤α	درصد percentage
Between groups	بین گروه‌ها	1	127.94	127.94	3.90	0.01	11
Within groups	درون گروه‌ها	50	1505.08	30.10	30.1		89
Total	کل	51	1633.02		34.01		100

تنش‌های گرما و خشکی از اصلی‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولید دانه غلات در دیم‌زارهای مناطق گرم و خشک است. کاهش عملکرد حاصل از تاثیر تنش عمدتاً ناشی از کوتاه شدن مراحل رشد و اندازه‌ی گیاه است (Zhong-hu and Rajaram, 1993).

تنش خشکی سبب ایجاد اثرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در گیاهان می‌شود. ارزیابی عملکرد دانه در مناطق با تنش فراوان، معمول‌ترین معیار عملی برای توصیف سازگاری ارقام برای شرایط پرتنش است (Gavuzzi *et al.*, 1993).

اثر تنش خشکی در مراحل رشدی مختلف جو در دیم‌زارها نشان داده که تنش خشکی در قبل و طی زمان ظهور سنبله و طی گرده‌افشانی و مراحل اولیه توسعه دانه بسیار زیان‌آور است. در دیم‌زارها، طولانی شدن تنش خشکی از ظهور سنبله تا مرحله رسیدگی عملکرد دانه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین تسریع در سنبله‌دهی ممکن است اجازه دهد گیاهان چرخه زندگی

خود را قبل از این که تنش خشکی شدت بگیرد تکمیل کنند (Samarah, 2005) به عبارت دیگر از خشکی فرار کنند. فرار از تنش خشکی از کاهش عمده عملکرد دانه در زراعت وابسته به باران جلوگیری می‌کند.

محاسبه میانگین عملکرد و دیگر صفات مورد بررسی برای دو گروه اصلی انجام شد (جدول ۴). بیشتر ژنوتیپ‌های گروه ۲، ژنوتیپ‌های دو ردیفه بودند. نیکخواه و همکاران (Nikkhah *et al.*, 2010) بیان گزارش کردند که به‌طور کلی در شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ‌های جو دو ردیفه نسبت به جو شش ردیفه دیررس‌تر بوده، وزن هزار دانه و تحمل به خشکی بیشتری دارند.

جدول ۴- میانگین گروه‌های اصلی حاصل از تجزیه خوشه‌ای از نظر صفات سازگاری به خشکی در ژنوتیپ‌های جو

Table 4. Mean major groups produced of cluster analysis for drought compatibility traits in the barley genotypes

Groups	گروه‌ها	روز تا ظهور سنبله Days to heading	روز تا رسیدگی فیزیولوژیک Days to physiological ripeness	روز تا پرشدن دانه Grain filling (day)	وزن هزار دانه Thousand kernel weight (g)	کیلوگرم عملکرد در پلات Yield (kg/plot)
Group 1	گروه ۱	149.75	173.73	23.97	43.05	0.22
Group 2	گروه ۲	149.56	177.18	27.61	48.50	0.24

نتایج تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها براساس نشانگرهای ریزماهواره و ارزش فنوتیپی آن‌ها برای پنج صفت وابسته به سازگاری به خشکی برای شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات در جدول ۵ درج شده است. اکثر نشانگرهای مثبت شناسایی شده در ارتباط با صفات مرتبط با سازگاری به خشکی روی کروموزوم‌های ۵ و ۶ قرار دارند. همچنین، نشانگرهای مثبت مشترک در این صفات دیده می‌شود. وجود نشانگرهای مشترک برای برخی صفات، احتمالاً به‌دلیل پیوستگی مکان‌های کروموزومی کنترل‌کننده این صفات و یا پلیوتروپی است (به نقل از فاخری و مهرآوران (Fakheri and Mehravaran, 2013). چندین QTL هم مکان برای صفات متفاوت گزارش شده است و هم مکانی QTLها به واسطه پیوستگی دو ژن یا اثر پلیوتروپی یک ژن است که در حالت دوم همبستگی بین صفات هرگز شکسته نمی‌شود. نشانگر GBM1231_1 در دو صفت روز تا سنبله‌دهی و روز تا رسیدگی فیزیولوژیک دارای ضریب منفی بود، بدین معنی که منجر به کاهش تعداد روز تا سنبله‌دهی و رسیدگی فیزیولوژیک می‌شود. نشانگر Bmag0613_3 دارای ضریب مثبت در صفت روز تا سنبله‌دهی و ضریب منفی در صفات روز تا پرشدن دانه و وزن هزار دانه بود، که منجر به

جدول ۵- نام، جایگاه کروموزومی و ضریب رگرسیون نشانگرهای مثبت برای صفات مرتبط با سازگاری به خشکی در ژنوتیپ‌های جو

Table 5. Name, chromosomal location and regression coefficient of informative markers for traits related to drought compatibility in barley genotypes

صفت Trait	نشانگر مثبت Informative markers	شماره کروموزوم Chromosome number	ضریب رگرسیون Regression coefficient	ضریب رگرسیون استانداردشده Standardized regression coefficient
روز تا ظهور سنبله Days to heading	Bmag0613_3	6	4.414 ± .655	.571
	GBM1231_1	5	-2.067 ± .688	-.243
	Bmag0138_3	4	-1.709 ± .508	-.274
	scssr07106-1	5	1.641 ± .508	.261
روز تا رسیدگی فیزیولوژیک Days to physiological maturity	GBM5008_3	5	1.571 ± .629	.279
	GBM1231_1	5	-3.077 ± .828	-.398
	GBM1490_3	5	1.985 ± .706	.308
	GBM1412_4	1	-3.506 ± 1.261	-.293
روز تا پرشدن دانه Days to grain filling	GBM1295_4	5	3.096 ± .765	.458
	Bmag0613_3	6	-3.378 ± .934	-.409
وزن هزار دانه Thousand kernel weight	GBM1149_3	2	5.440 ± 1.458	.330
	Bmag0613_3	6	-6.854 ± 1.711	-.322
	scssr07106-3	5	-3.758 ± 1.251	-.229
	Bmag0613_5	6	-6.457 ± 1.543	-.330
	GBM5008_1	5	-7.661 ± 2.299	-.320
عملکرد کیلوگرم در پلات Yield (kg/plot)	GBM1149_4	2	-.059 ± .018	-.370
	scssr07106-1	5	-.060 ± .017	-.385
	Bmag0613_4	6	.057 ± .021	.285

افزایش تعداد روز تا سنبله‌دهی و کاهش تعداد روز تا پر شدن دانه و وزن هزار دانه می‌گردد. نشانگر scssr07106-1 روز تا ظهور سنبله را افزایش و عملکرد کیلوگرم در پلات را کاهش می‌دهد. فاخری و مهرآوران (Fakheri and Mehravaran, 2013) برخی QTLهای عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی را روی کروموزوم ۴، باام و همکاران (Baum *et al.*, 2003) برخی QTLهای کنترل‌کننده صفات وزن هزار دانه (روی کلیه کروموزوم‌ها)، عملکرد (روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۴، ۵ و ۷) و روز تا ظهور سنبله (روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۷) را در مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا) شناسایی کردند. محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2008) برخی QTLهای وزن هزار دانه در شرایط تنش خشکی را روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۶ و ۷ و QTLهای عملکرد در شرایط تنش خشکی را روی کروموزوم‌های ۱، ۲ و ۶ شناسایی کردند. در این پژوهش نیز نشانگرهای مثبت روز تا ظهور سنبله روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۶ و نشانگرهای مثبت وزن هزار دانه و عملکرد روی کروموزوم‌های ۲، ۵ و ۶ قرار داشت. از ارتباط معنی‌دار این نشانگرهای مولکولی مثبت با صفات می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی برای

گزینش غیرمستقیم به منظور بهبود و اصلاح صفات ارزیابی شده در ارتباط با سازگاری به خشکی تحت شرایط دیم بهره جست. نتایج این پژوهش تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که این تنوع با صفات اندازه‌گیری شده در جو ارتباط نسبتاً خوبی داشت.

برآورد دقیق سطح تنوع ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های به‌نژادی در گیاهان زراعی است. بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها و گروه‌بندی آن‌ها می‌تواند برای برنامه‌های دورگ‌گیری و تهیه ژنوتیپ‌های برتر مورد توجه قرار گیرد. همچنین، با استفاده از این روش می‌توان در جهت تعیین خصوصیات ژنوتیپ‌ها برای ثبت و محافظت ارقام موجود استفاده کرد و به طور موثری در جهت اصلاح آن‌ها گام برداشت.

References

Abdollahi Sisi, N., Mohammadi, S. A., Alavi Kia, S. S., and Sadeghzadeh, B. 2014. Allelic diversity of SSR markers in barley landraces and lines. Seed and Plant Improvement Journal 30-1 (2):477-492 (in Persian).

Anonymous 2010. FAO Statistical Database. Available at: http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture.

Baik, B. K., and Ullrich, S. 2008. Barley for food: characteristics, improvement and renewed interest. Journal of Cereal Science 48: 233-242.

Baum, M., Grando, S., Bakes, G., Jahoor, A., and Ceccarelli, S. 2003. QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environments identified in recombinant inbred lines of the cross Arta×*H. spontaneum*. Theoretical and Applied Genetics 107: 1215-1225.

Bolouri-Moghaddam, M. R., Safarnejad, A., and Kazemitabar, K. S. 2011. Genetic diversity assessment in several barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using microsatellite markers. Notulae Scientia Biologicae 3(2): 140-144.

Castillo, A., Dorado, G., Feuillet, C., Sourdille, P., and Hernandez, P. 2010. Genetic structure and ecogeographical adaptation in wild barley (*Hordeum chilense* Roemer et Schultes) as revealed by microsatellite markers. BMC Plant Biology 10: 266.

Cosson, P., Decroocq, V., and Revers, F. 2014. Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core. Plant Methods 10: 2.

Fakheri, B. A., and L. Mehravaran. 2013. Locating QTLs controlling agronomic traits of “Steptoe×Morex” derived double haploid population of barley under drought stress conditions. Iranian Journal of Field Crop Science 44 (1): 47-57 (in Persian).

Farshadfar, E. 1997. Breeding Methodology. Razi University of Kermanshah, Kermanshah, Iran (in Persian).

Ganjkhanloo, E., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Ghassemi Golezani, K., Shakiba, M.R., and Yousefi, A. 2012. Genetic diversity in barley as revealed by microsatellite markers and association analysis of these markers by traits related to freezing tolerance. Seed and Plant Improvement Journal 28-1 (1): 101-114 (in Persian).

Gavuzzi, P., Delougu, G., Boggini, G., DI Fonzo, N., and Borghi, B. 1993. Identification of bread wheat, durum wheat and barley cultivars adapted to dry areas of Southern Italy. Euphytica 68: 131-145.

Haj Mansour, S., Bihamta, M. R., Nabipour, A., Mohammdi, A., Pyrseyedi, S. M., and Nikkhah, H. R. 2010. Genetic diversity in barley genotypes: II. Microsatellite markers and morphological characters. Seed and Plant Improvement Journal 26-1 (2):151-171 (in Persian).

Hamza, S., Ben Hamida, W., Rebai, A., and Harrabi, M. 2004. SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. Euphytica 135: 107-118.

Huff, D. R., Peakall, R., and Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among natural population of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. Theoretical and Applied Genetics 86: 927-934.

Khodayari, H., Saeidi, H., Akhavan, A., Pourkheirandish, M., and Komatsuda, T. 2014. Microsatellite analysis of genetic diversity of wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) using different sampling methods in Iran. Iranian Journal of Botany 20 (1): 41-50 (in Persian).

Kölliker, R., Jones, E. S., Drayton, M. C., Drupal, M. P., and Forster, J. W. 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). Theoretical and Applied Genetics 102: 416-424.

Liu, J. 2004. PowerMarker V3.25 Manual. http://www.powermarker.net.

Luan, Sh., Chiang, T-Y., and Gong, X. 2006. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Noelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in china, revealed by ISSR fingerprinting. Annals of Botany 98: 583–589.

Malysheva-Otto, L. V., Ganal, M. W., and Röder, M. 2006. Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). BMC Genetic 7: 6-15.

McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., Huang, N., Ishii, T., and Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology 35: 89-99.

Meszaros, K., Ildiko, K., Csaba, K., Judit, B., Laszlo, L., and Zoltan, B. 2007. Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). South African Journal of Botany 73: 43-48.

Mohammadi, M., Taleei, A., Zeinali, H., Naghavi, M. R., and Baum, M. 2008. Mapping QTLs controlling drought tolerance in a barley doubled haploid population. Seed and Plant Improvement Journal 24-1 (1):1-15 (in Persian).

Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. H. E., and Yano, M. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3: 87-103.

Nachit, M.M., Elouafi, I., Pagnotta, M.A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, M., Hazam, H., Benscher, D., Khairallah, M., Ribaut, J.-M., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., and Sorrells, M. E. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). Theoretical and Applied Genetics 102: 177-186.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nikkhah, H. R., Saberi, M. H., and Mahlouji, M. 2010. Study of effective traits on grain yield of two and six row barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) under terminal drought stress conditions. Iranian Journal of Crop Sciences 12 (2): 170-184 (in Persian).

Pasam, R. K, Sharma, R., Walther, A., Özkan, H., Graner, A., and Kilian, B. 2014. Genetic diversity and population structure in a legacy collection of spring barley landraces adapted to a wide range of climates. PLoS One 9(12): e116-164.

Peakall, R., and Smouse, P. E. 2008. GenAlEx 6.2: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

Pillen, K., Binder, A., Kreuzkam, B., Ramsay, L., Waught, R., Förster, J., and Leon, J. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellite and their use in differentiating German barley cultivars. Theoretical and Applied Genetics 1011: 652-660.

Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3: 136-145.

Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014- 8018.

Samarah, N. H. 2005. Effects of drought stress on growth and yield of barley. Agronomy for Sustainable Development 28: 145–149.

Senior, M. L., Murphy, J. P., Goodman, M. M., and Stuber, C. W. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. Crop Science 38: 1088–1098.

Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Gill, B. S., Ward, R., and Cregan, P. B. 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. Theoretical and Applied Genetics 110: 550–560.

Struss, D., and Plieske, J. 1998. Use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. Theoretical and Applied Genetics 97: 308- 315.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Tamura, K., Peterson. D., Peterson, N., Stecher, G., Neil, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731–2739.

Tanksley, S. D., and McCouch, S. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science 227: 1063-1066.

Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W. L., Zhang, Z. Q., Liu, D. C., and Zhang, Y. L. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to fusarium head blight. Theoretical and Applied Genetics 46: 3-9.

Weir, S. 1990. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data. pp: 124-125. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Xu,**J., Qian, X., Wang, X.**, **Li**, **R., Cheng**, **X., Yang**, **Y., Fu**, **J., Zhang, S., King**, **G. J., Wu, J., and Liu, K. 2010**. Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of *Brassica napus* using SSR markers derived from sequenced BACs in *B. rapa.* BMC Genomics 11-594.

Zhong-hu, H., and Rajaram, S. 1993. Differential responses of bread wheat characters to high temperature. Euphytica 72(3): 197-203.